

THESIS

BONN

1967

**Vergleich dreier Methoden zur
Bestimmung von Ammoniak im Blut**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

zu Bonn

vorgelegt von

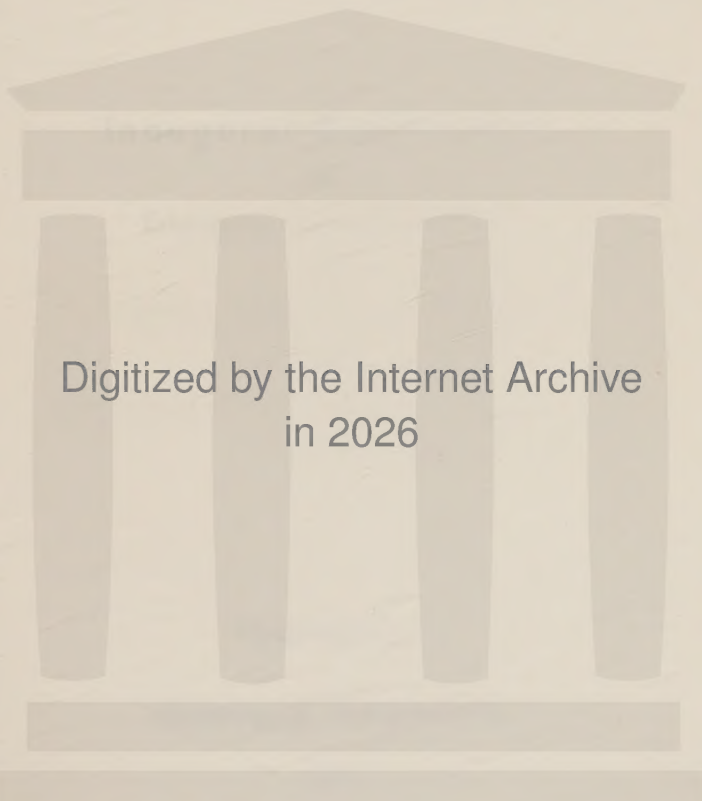
Rosemarie Wegmann

aus

Bad Godesberg

Bonn 1967

LANE MEDICAL LIBRARY OF
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR
PALO ALTO, CALIFORNIA



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Vergleich dreier Methoden zur Bestimmung von Ammoniak im Blut

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt von

Rosemarie Wegmann

aus

Bad Godesberg

Bonn 1967

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

Referent: Professor Dr. H. B r e u e r

Korreferent: Professor Dr. A. G ü t g e m a n n

Tag der mündlichen Prüfung: 26.5.1967

Aus der Chirurgischen Universitäts-Klinik Bonn

Direktor: Professor Dr. A. G ü t g e m a n n

I N H A L T

	Seite
I. Literaturverzeichnis	5
II. Einleitung	7
1. Die Entstehung von Ammoniak im Organismus	7
2. Die Entgiftung von Ammoniak im Organismus	8
3. Die Pathogenese der Hyperammonämie	8
4. Verschiedene Methoden zur Blutammoniakbestimmung	10
III. Methodik	14
1. Die CONWAY-Methode modifiziert nach ROMAN u.NADER	14
2. Die enzymatische Methode von E.KIRSTEN, GEREZ und R.KIRSTEN	15
3. Die Methode von MÜLLER-BEISSENHIRTZ und KELLER	16
4. Die Berechnung der Ammoniakwerte	17
5. Versuchspersonen	19
IV. Ergebnisse	20
V. Diskussion	24
1. Allgemeine Gesichtspunkte	24
2. Methodenkritik	25
a) Zuverlässigkeit	25
b) Apparativer Aufwand	26
c) Zeitbedarf	26
d) Schwierigkeitsgrad	27
3. Schlußfolgerung	27
VI. Zusammenfassung	28

I. Literaturverzeichnis

=====

- BESSMAN, S.P. und A.N.BESSMAN: The cerebral and peripheral uptake of ammonia in liver disease with hypothesis for the mechanism of hepatic coma. *J.clin.Invest.* 34, 623 (1954)
- CONWAY, E.J.: Apparatus for the micro-determination of certain volatile substances. IV. The blood ammonia with observations on normal human blood. *Biochem.J.* 29, 2755 (1935)
- EGENSE, J.: Ammonia and hepatic coma. *Acta Med.Scand.* 173, 1 (1963)
- FOLIN, O. und DENIS, W.: New methods for the determination of total non-protein nitrogen, urea and ammonia in blood. *J.biol.Chem.* 11, 527 (1912)
- FOREMAN, D.T.: Rapid determination of plasma ammonia by an ion-exchange technic. *Clin.Chem.* 10, 497 (1964)
- FULD, H.: Über die diagnostische Verwertbarkeit von Ammoniakbestimmungen im Blut. *Klin.Wschr.* 12, 1364 (1933)
- KIRSTEN, E., C.GEREZ und R.KIRSTEN: Eine enzymatische Mikrobestimmung des Ammoniaks, geeignet für Extrakte tierischer Gewebe und Flüssigkeiten. *Biochem.Z.* 337, 312 (1963)
- KREBS, H.A. und K.HENSELEIT: Untersuchungen über die Harnstoffbildungen im Tierkörper. *Hoppe-Seylers Z.physiol.Chem.* 210, 32 (1932)
- KÜHN, A.: Die Pathogenese des Koma hepaticum. *Dtsch.Med.Wschr.* 83, 658 (1958)
- LEUTHARDT, F.: Lehrbuch der Physiologischen Chemie. Walter de Gruyter & Co., Berlin 1963, S.378 und 388
- MARTINI, G.A., G.STROMEYER und W.DÖLLE: Die Behandlung des Leberkomas mit antibiotischen Mitteln. *Medizinische* 52, 2549 (1959)
- MARTINI, G.A. und J.P.WIEBEL: Ammoniakbestimmung im Blut zur Differentialdiagnose akuter Blutungen im oberen Verdauungskanal. *Med.Klin.* 59, 618 (1964)
- MÜLLER-BEISSENHIRTZ, W. und H.KELLER: Zur Bestimmung des Blutanmoniaks. *Klin.Wschr.* 43, 43 (1965a)
- MÜLLER-BEISSENHIRTZ, W. und H.KELLER: Ammoniak in der Expirationsluft. *Klin.Wschr.* 43, 575 (1965b)
- NENCKI, M., J.P.PAWLOW und J.ZALESKI: Über den Ammoniakgehalt des Blutes und der Organe und die Harnstoffbildung bei den Säugetieren. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp.Path.Pharmak.* 37, 26 (1896)

- NENCKI, M. und J. ZALESKI: Über die Bestimmung des Ammoniaks in tierischen Flüssigkeiten und Geweben. Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp.Path.Pharmakol. 36, 385 (1895)
- PARNAS, J.K. und J. HELLER: Über den Ammoniakgehalt und über die Ammoniakbildung im Blute. Biochem.Z. 152, 1 (1924)
- PARNAS, J.K. und A. KLISIECKI: Über den Ammoniakgehalt und die Ammoniakbildung im Blute. Biochem.Z. 173, 224 (1926)
- PAGET, M. und P. COUSTENOBLE: Technique de dosage de l'Ammoniémie. Ann.Biol.clin. 22, 489 (1964)
- PITZLER, K. und R. REICHMANN: Über die Bestimmung des Ammoniakspiegels im venösen Blut vor und nach portocavalen Shuntoperationen. Zbl.Chir. 86, 943 (1961)
- PHEAR, E.A., S. SHERLOCK und W.H. SUMMERSKILL: Blood ammonium levels in liver disease and "hepatic coma". Lancet 1955, I, 836
- REIN, H. und M. SCHNEIDER: Einführung in die Physiologie des Menschen. Springer, Berlin, Göttingen, Heidelberg 1960, S.326
- ROMAN, W. und C. NADER: The estimation of ammonia in blood. Biochimica applicata (1961)
- RUSSELL, J.A.: The colorimetric estimation of small amounts of ammonia by the phenol-hypochlorit reaction. J.biol.Chem. 156, 457 (1944)
- SCHLENKER, C.: Zur Bestimmung der Blutammoniak-Konzentration bei chronischen Leberkrankheiten. Inaug.Diss. Bonn, 1963
- STAHL, J.: Arterielle und venöse Blutammoniakstudien bei Leberkrankheiten. Dtsch.Med.J. 10, 325 (1959)
- THÖLEN, H. und R. BOSSHARDT: Über den Blutammoniakgehalt urämischer Patienten. Klin.Wschr. 36, 574 (1958)
- WALSER, M. und L.J. BODENLOS: Urea metabolism in man. J.clin.Invest. 38, 1617 (1959)
- WELLER, H.: Die Verwendung der Berthelotschen Reaktion auf Ammoniak in der klinischen Chemie. Röntgen- und Labor Praxis 15, L 77 und L 142 (1962)
- ZÖLLNER, N. und P. BIRK: Die Bestimmung des Blutammoniaks und ihre Ergebnisse bei Leberkrankheiten. Klin.Wschr. 36, 570 (1958)

II. EINLEITUNG

=====

1. Die Entstehung von Ammoniak im Organismus

In jeder Körperzelle entsteht auf Grund des oxydativen Stoffwechsels der Aminosäuren und anderer N-haltiger Substanzen Ammoniak, wie z.B. bei der oxydativen Desaminierung der Aminosäuren durch die Aminosäureoxydase oder beim Abbau von Aminen zu Aldehyden durch die Aminoxydase (vgl. LEUTHARDT, 1963).

In den Tubulussellen der Niere entsteht Ammoniak aus Glutaminsäure unter Einwirkung der Glutaminase. Anstelle der H^+ -Sekretion, die bei sinkendem Urin-pH nicht mehr möglich ist, tritt die Ammoniakausscheidung, um einem zu hohen Basenverlust entgegenzuwirken. Die Bildung von Ammoniak hängt bei ausreichenden Substrat- und Enzymmengen allein vom pH des Urins ab. Bei sinkendem Urin-pH kann Ammoniak leicht in den Tubulus diffundieren. Dort geht es in das nicht diffundierbare Ammoniumion über und hält so das Konzentrationsgefälle für Ammoniak im Tubulus aufrecht (vgl. REIN und SCHNEIDER, 1960).

Im Intestinaltrakt entsteht die größte Menge von Ammoniak. Bei der bakteriellen Zersetzung der Eiweißnahrung kommt es zur Bildung von Ammoniak. Auch der Harnstoff des Blutes, der in den Verdauungskanal diffundiert, wird durch die Bakterien abgebaut: Die Versuche von WALSER und BODENLOS 1959 zeigten, daß i.v. injizierter Harnstoff zum Teil in den Darm diffundiert und dort ebenfalls durch die intestinalen Bakterien hydrolysiert wird. Das entstandene Ammoniak wird von dem Blut aufgenommen. Es findet sich in den arteriellen und venösen Schenkeln des Gefäßsystems. Bei lebergesunden Patienten besteht keine arterio-venöse Differenz (SCHLENKER, 1963). Nur in der Pfortader findet man Ammoniak vermehrt, weil die größte Menge des Ammoniaks im Intestinaltrakt gebildet und durch die Vena portae sofort der Leber zugeführt wird.

2. Die Entgiftung von Ammoniak im Organismus

Für die Eliminierung des Ammoniaks kommt der Leber die größte Bedeutung zu. Die Untersuchungen von KREBS und HENSELEIT (1932) haben gezeigt, daß die Leber aus dem Blutammoniak Harnstoff bildet und so die Überschwemmung des Körpers mit hohen Konzentrationen toxisch wirkenden Ammoniaks verhindert. Demgegenüber ist die Eliminierung des Ammoniaks in anderen Organen des Körpers von untergeordneter Bedeutung.

Die durch die Lunge mit der Atemluft ausgeschiedene Menge Ammoniak ist individuellen Schwankungen unterlegen, wie MÜLLER-BEISSENHIRTZ und KELLER 1965 zeigen konnten. Aus diesem Grunde kann man aus dem Ammoniakgehalt der Atemluft keine quantitativen Schlüsse ziehen. Der Ammoniakgeruch bei komatösen Zuständen kann lediglich diagnostische Hinweise geben. BESSMAN und BESSMAN (1954) glauben auf Grund positiver arterio-venöser Ammoniakdifferenzen bei Leberkranken, daß freies Blutammoniak vom Gehirn und vom Muskel verbraucht wird. Zwei Reaktionen scheinen ihnen von Bedeutung: Die Glutaminsynthese und die reversible Glutamatoxydation, namentlich die reduktive Aminierung von alpha-Ketoglutarat.

Als therapeutische Maßnahmen bei der Hyperammonämie im Verlaufe eines komatösen Zustandes haben sich hauptsächlich eiweißfreie Nahrung und Antibiotikagaben bewährt (MARTINI, STROMEYER und DOLLE, 1959). Auf diese Weise wird der Ammoniakbildung im Intestinaltrakt entgegengewirkt.

3. Die Pathogenese der Hyperammonämie

Es gibt zwei Formen der Hyperammonämie. Die eine Form der Ammoniakerrhöhung im Blut entsteht auf Grund einer Schädigung der Leberzellen; dabei können die Ursachen der Leberschädigung verschieden sein. So kommt es bei allgemeiner Anoxämie - Atmung O₂-armer Gasgemische oder Kohlenoxydvergiftung (PARNAS und KLISIECKI, 1926), Pneumonien und ausgedehnten spezifischen Lungenprozessen (FULD, 1933), Blutdruckabfall, Anämie (KÜHN, 1958) zur Schädigung

der Leber und somit zur Behinderung der Ammoniakentgiftung. Ebenso beobachtet man, wie schon NENCKI, PAWLO und ZALESKI 1896 angegeben haben, bei speziellen Erkrankungen der Leber erhebliche Störungen des Arginin-Ornithin-Zyklus in der Leber.

Davon zu trennen ist eine zweite Form der Hyperammonämie. Bei einem praehepatischen Block (ECK'scher Fistel ohne Leberschädigung, Pfortaderthrombose, raumfordernde Tumoren im Bereich der Vena portae) erfolgt eine Ammoniakserhöhung im Blute, ohne daß Leberfunktionsstörungen nachweisbar wären. In diesem Falle ist die Harnstoffsynthese auch nicht gestört, sondern lediglich verzögert. Das ammoniakhaltige Blut gelangt erst über die Anastomosen in die Vena cava, in den kleinen und z.T. in den großen Kreislauf, ehe es durch die Arteria hepatica die Leber erreicht, in der Ammoniak dann eliminiert wird.

Die Bestimmung des Blutammoniaks hat nicht nur theoretische Bedeutung, sondern ist bei folgender Symptomatik auch von praktischem Interesse: 1. zur Differentialdiagnose intestinaler Blutungen und 2. bei komatösen Zuständen. Intestinale Blutungen können u.a. durch ein Ulcus, ein Krebsleiden, durch Polypen oder Entzündungen im Magen-Darmbereich entstehen. Bei diesen krankhaften Veränderungen ist der Blutammoniakspiegel nicht erhöht. Auch komatöse Zustände bei Hypoglykämie oder bei thyreotoxischen Krisen führen nicht zur Erhöhung der Ammoniakkonzentration im Blut. Im Gegensatz dazu ist der Ammoniakspiegel bei Blutungen aus dem Umgehungskreislauf der Vena portae (Oesophagusvarizen) und im Leberkoma erhöht, denn beide Krankheitszustände sind die Folge schwerer Leberschädigung.

MARTINI und WIEBEL (1964) bestimmten den Blutammoniakwert bei 26 Patienten, die Blut erbrochen hatten und deren Anamnese unbekannt war. Nur in vier Fällen war das Ergebnis der Untersuchungen diagnostisch nicht zu verwerten. Bei den anderen 22 Fällen stimmte die Höhe des Ammoniakspiegels mit dem klinischen Befund überein. Ebenso ist die Höhe des Blutammoniaks komatöser Patienten ein wertvoller Hinweis zur Differentialdiagnose des Komas, denn in aller Regel ist das Blutammoniak im Leberkoma erhöht (BESSMAN

und BESSMAN, 1954; PHEAR, SHERLOCK und SUMMERSKILL, 1955; KÜHN, 1958; MARTINI, STROMEYER und DÖLLE, 1959; EGENSE, 1963).

4. Verschiedene Methoden zur Blutammoniakbestimmung

Da schon seit Jahrzehnten der Blutammoniakspiegel von klinischem Interesse ist, sind viele Methoden der Ammoniakbestimmung entwickelt worden, von denen im Folgenden einige kurz erwähnt seien.

Die ersten Ammoniakbestimmungen im Blut und Gewebe dürften von NENCKI und ZALESKI (1895) entwickelt worden sein. Die zu untersuchende Probe wurde in einem geschlossenen Raum mit Kalkmilch, später (1901) mit schwach alkalischem Magnesiumoxyd versetzt und auf 35° erhitzt. Die Destillation dauerte fünf Stunden. Die sich entwickelnden Gasblasen leitete man in 0,1 n Schwefelsäure, die das freigewordene Ammoniak band. Mit 0,25 n Natronlauge wurde die Säure zurücktitriert, wobei Methylorange als Indikator diente.

Im Jahre 1912 veröffentlichten FOLIN und DENIS ihre Untersuchungen. Ihr Prinzip war die Durchlüftungsmethode, wobei kleine Blutmengen nur kurz durchlüftet wurden. Fünf bis zehn ml Blut wurden mit Kaliumoxalat und Natriumcarbonat alkalisiert. Durch einen raschen Luftstrom wurde das Ammoniak in 20 bis 30 Minuten bei 0° ausgetrieben, in verdünnter Säure aufgefangen und mittels Nessler's Reagens, anstelle der Titration, kolorimetrisch bestimmt.

PARNAS und HELLER (1924) veröffentlichten eine neue Methode: "Das Prinzip der neuen Methode besteht darin, daß man die flüchtige Base nicht durch einen Luftstrom, sondern durch Wasserdampf im luftleeren Raum überdestilliert. Sie vereinigt die Vorteile der Vakuumdestillation und der Lüftungsmethode und übertrifft jede von beiden." Alkalisiertes Blut wurde im luftleeren Raume mit Wasserdampf durchströmt, der, aus dem Blut ausgetrieben, durch Kühlung kondensiert. Die Ammoniakwerte werden durch kolorimetrischen Vergleich mit Ammoniakstandardlösungen ermittelt.

CONWAY (1935) führte eine neue Technik ein, um Ammoniak aus den Blutproben zu entfernen. Das Prinzip war die Mikrodifffusion. Dabei wurde Ammoniak durch Kaliumkarbonat ausgetrieben und in verdünnter Säure aufgefangen. Diese Säure wurde mit Bariumhydroxyd zurücktitriert und so das "freigewordene" Ammoniak bestimmt. Viele Methoden der Blutammoniakbestimmung basieren auf der CONWAY'schen Art der Ammoniakfreisetzung. Die Unterschiede der Methode liegen dabei nur in der Bestimmung des "freigewordenen" Ammoniaks.

RUSSELL beschrieb 1944 eine kolorimetrische Bestimmung von kleinen Ammoniakmengen. Die blaue Farbe, die bei der Bestimmung entsteht, beruht auf einer Phenol-Hypochlorit-Reaktion, wobei Indophenol oder eine verwandte Substanz entsteht. Als Katalysator der Reaktion dient zweiwertiges Mangan.

1958 veröffentlichten ZÖLLER und BIRK eine Methode, bei der nach der Mikrodifffusion des Ammoniaks in CONWAY-Schälchen die Schwefelsäure nach Zusatz von einem Tropfen Kjeldahlindikator mit 0,001 n Natriumhydroxyd zurücktitriert wird.

WELLER (1962) verweist auf eine Reaktion, die schon 1859 von BERTHOLET angegeben wurde: Ammoniak, Natriumphosphat und Hypochlorit geben eine tiefblaue Farbe, einen Farbstoff vom Typ der Indophenole.

Erst in den letzten Jahren weichen einige Methoden vom Prinzip der Mikrodifffusion ab. 1963 veröffentlichten KIRSTEN, GEREZ und KIRSTEN eine enzymatische Methode zur Bestimmung des Blutammoniaks. Die Reaktion läuft im neutralen Milieu ab:

$\text{Glutamat} + \text{NAD}^{\oplus} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{alpha-Ketoglutarat} + \text{NH}_4^{\oplus} + \text{NADH} + \text{H}^{\oplus}$,
wobei das Enzym Glutamatdehydrogenase die Reaktion katalysiert. Die Oxydation von $\text{NADH} + \text{H}^{\oplus}$, die proportional der $\text{NH}_4^{\oplus}$ -Konzentration ist, wird im Photometer bei 366 m μ gemessen.

FOREMAN gibt 1964 eine Ionenaustauschermethode an. Stark saurer, kationenaustauschender Harz adsorbiert das Blutammoniak. Das Ammoniumion wird dann eluiert und reagiert mit Natriumphenoxyd und Hypochlorit, wobei eine beständige blaue Farbe entsteht. Die Farbintensität wird kolorimetrisch bestimmt.

1965 veröffentlichten MÜLLER-BEISSENHIRTZ und KELLER eine Methode, die auf der Phenol-Hypochlorit-Reaktion beruht. Das Vollblut wird mit Trichloressigsäure enteiweißt und zentrifugiert. Den klaren Überstand läßt man mit einer Phenolat- und einer Hypochlorit-Lösung reagieren. Dabei entsteht eine blaue Farbe, deren Intensität vom Ammoniakgehalt der Mischung abhängig ist.

Im Folgenden sind drei Methoden (die Methode nach CONWAY, modifiziert nach ROMAN und NADER; die enzymatische Methode nach KIRSTEN, GEREZ und KIRSTEN; die Methode nach MÜLLER-BEISSENHIRTZ und KELLER), denen ein unterschiedliches Reaktionsprinzip zu Grunde liegt, geprüft und miteinander verglichen worden. Es wurde besonderer Wert darauf gelegt, von den angeführten Methoden diejenige zu finden, die schnell, technisch am wenigsten aufwendig und stör anfällig und doch genau ist.

Die bisher beim Menschen nachgewiesenen Normalwerte der Ammoniakkonzentration im Blut sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1 Normalwerte der Ammoniakkonzentration
in $\mu\text{g NH}_3\text{-N/100 ml}$ venösen Blutes

Autoren	Jahr	Prinzip der Methode	Mittelwert	Streuung	Standardabweichung
BESSMAN u. BESSMAN	1954	Mikrodiffusion (Seligson, modifiz.)	92		
PHEAR, SHERLOCK u. SULLERSKILL	1955	Mikrodiffusion und Titration (Conway)	77		
THÖLEN u. BOSSHARDT	1958	Mikrodiffusion u. Titration (Conway)	42		± 16
ZÜLLNER u. BIRK	1958	Mikrodiffusion und Titration	52		± 7
STAHL	1959	Wasserdampfdurchströmung u. kolorimetrische Bestimmung (Parnas)	55		
PITZLER u. REICHMANN	1961	Mikrodiffusion und Titration (Conway)		80-130	
WELLER	1962	Diffusion u. Berthelot-Reaktion		40-90	
EGENSE	1963	Mikrodiffusion (Seligson)	90		
KIRSTEN, GEREZ u. KIRSTEN	1963	Enzymatische Mikrobestimmung	85		
SCHLENKER	1963	Mikrodiffusion (Conway, modifiz.) und kolorimetrische Bestimmung	38		
FORMAN	1964	Ionen-Austausch	52	23-69	
MARTINI u. WIEBEL	1964	Mikrodiffusion (Conway) und kolorimetrische Bestimmung	53		± 13
PAGET u. COUSTENOBLE	1964	Durchlüftungsmethode und kolorimetrische Bestimmung	70		$+ 30$
MÜLLER-BEISSENHIRTZ u. KELLER	1965	Kolorimetrische Bestimmung	47	23-85	

III. M E T H O D I K

=====

1. Die CONWAY-Methode modifiziert nach ROMAN und NADER

Reagenzien:

- a) Aqua bidest.
- b) Kaliumoxalat.
- c) Glyzerin-Lösung, hergestellt aus 9 Volumenteilen Glyzerin und 1 Teil Aqua bidest. unter Zusatz von einem Tropfen Phenolphthalein als Indikator. Dann wird so viel n NaOH zugesetzt, bis ein Umschlag nach rosa erfolgt.
- d) 0,001 n H_2SO_4 .
- e) Heiß gesättigte NH_3 -freie K_2CO_3 -Lösung.
- f) 0,004 n $MnCl_2$ -Lösung.
- g) Hypochlorit-Lösung: 25 g Calcium-Hypochlorit werden soweit wie möglich in 300 ml heißem Wasser gelöst und 135 ml einer vorher kurz aufgekochten Kaliumkarbonat-Lösung hinzugegeben. Die Karbonat-Lösung enthält 20 g des wasserfreien Salzes in 100 ml Aqua bidest. Die vollständige Lösung wird gut geschüttelt, kurz auf 90° erhitzt, gekühlt, filtriert und mit Aqua bidest. auf 500 ml aufgefüllt.
- h) Natrium-Phenolat-Lösung: 25 g kristallines Phenol werden in wenig Wasser gelöst und 54 ml 5 n NaOH hinzugefügt. Die Lösung wird mit Aqua bidest. auf 100 ml aufgefüllt und in einer dunklen Flasche bei $+4^\circ$ im Kühlschrank aufbewahrt. Sie sollte täglich frisch hergestellt, keinesfalls aber länger als 2 Tage verwendet werden.

Methodik:

Das Blut wird einer ungestauten Vene entnommen und in ein mit CO_2 -Gas gefülltes Flaschchen gespritzt. Als Behälter dienen leere Penicillinflaschen, die mit Gummistopfen versehen sind. Für absolut luftdichten Verschuß sorgt eine Blechkapsel. Die Flaschchen enthalten Kaliumoxalat zur Verhinderung der Blutgerinnung.

Die Ränder der Conway-Schälchen, die aus Porzellan angefertigt wurden, werden mit Glyzerin bestrichen. Dann wird jedes Schälchen einzeln gefüllt und anschließend mit einer geschliffenen Glasplatte zugedeckt: in die innere Kammer pipettiert man 1 ml 0,001 n H_2SO_4 , an eine Stelle der äußeren Kammer 1 ml heiß gesättigte K_2CO_3 . In das gegenüberliegende Segment der äußeren Kammer wird 1 ml der zu untersuchenden Flüssigkeit (H_2O , NH_4 -Standard, Blut) pipettiert. Die beiden Flüssigkeiten sollen erst dann zusammenfließen, wenn das Schälchen mit der Glasplatte zugedeckt ist. Durch 25 gleichmäßige Schwenkungen wird das Blut mit der Alkalilösung vermischt. Während der nun folgenden Diffusionszeit absorbiert die in der inneren Kammer befindliche Schwefelsäure das durch Alkaleinwirkung freigesetzte Ammoniak. Nach 20 Minuten wird das Schälchen geöffnet und der inneren Kammer 0,5 ml H_2SO_4 entnommen und in ein Reagenzglas pipettiert. Dieses Reagenzglas steht eisgekühlt und enthält 0,5 ml Aqua bidest. und 2 kleine Tropfen MnCl_2 . Nachdem das Reagenzglas geschüttelt worden ist, wird 1 ml Hypochlorit-Lösung dazugegeben. Nun müssen die Reagenzien wieder gut gemischt werden, da sonst der Meßwert erfahrungsgemäß niedriger wird. Dann wird 1 ml Phenolat-Lösung dazugegeben und noch einmal geschüttelt. Jetzt können die Lösungen in den Reagenzgläsern, mit Paraffinfilm zugedeckt, so lange stehen, bis die Diffusionen aller Bestimmungen beendet sind. Abschließend werden die Reagenzgläser zur Farbentwicklung 5 Minuten in kochendes Wasser gestellt. Die Intensität der entstandenen grünen Farbe wird bei 625 m μ im Phonometer gegen Luft abgelesen.

Als Leerwert dient eine Leerdiffusion mit Aqua bidest.

2. Die enzymatische Methode nach KIRSTEN, GEREZ und KIRSTEN

Reagenzien:

- a) Aqua bidest.
- b) 20 % Trichloressigsäure (20 g TCE ad 100 ml Aqua bidest.)
- c) Methylrot
- d) 6 n NaOH

- e) 0,2 m Phosphatpuffer nach SOERENSEN pH 7,6
- f) alpha-Ketoglutaratsäure. 0,08 m alpha-Ketoglutaratsäure-Lösung in Wasser wird je nach Bedarf in kleinen Portionen (ca. 5 ml) mit 2 n NaOH bis pH 7 neutralisiert. Die neutrale Lösung ist bei +4° mehrere Tage haltbar.
- g) NADH (Biochemica Boehringer, Mannheim) Lösung in 0,2 m Phosphatpuffer pH 7,6 (10 mg pro ml).
- h) Testmischung: 29 ml 0,2 m Natriumphosphatpuffer pH 7,6
2 ml 0,08 m alpha-Ketoglutarat-Lösung
0,6 ml NADH -Lösung
- i) Glutamatdehydrogenase-S (Biochemica Boehringer, Mannheim), frei von Ammoniumionen (E.c 1.4.1.2).

Methodik:

Das Blut wird einer ungestauten Vene entnommen, im Verhältnis 1:1 mit 20 proz. TCE vermischt und 5 Min. bei 2000 Umdrehungen pro Min. zentrifugiert. Für den Leerwert werden Aqua bidest. und 20 proz. TCE im Verhältnis 1:1 gemischt. Zum klaren Überstand und zum Leerwert kommt ein Tropfen Methylrot als Indikator, dann wird bis zum Farbumschlag mit 6 n NaOH neutralisiert. In Zentrifugenröhrchen werden 1,5 ml Testmischung und 0,5 ml neutralisierter Überstand bzw. 0,5 ml neutralisiertes H₂O pipettiert. Die Röhrchen werden mit Paraffinfilm abgedeckt, geschüttelt und 10 Min. stehen gelassen. Dann werden beide Lösungen je in eine Cuvette umgeschüttet und im Photometer bei 366 mμ gegen Wasser abgelesen. Nachdem beide Lösungen wieder in Röhrchen umgefüllt sind, werden jeweils 20 μl Glutamatdehydrogenase dazugegeben und gut umgeschüttelt. Nach ca. 15 Min. werden die Gemische wieder in die Cuvetten gefüllt, und nach 20 Min. liest man die Extinktionen ab. In den dazwischenliegenden 15 Min. sind die Cuvetten frei, um die Extinktionen der Doppelbestimmungen abzulesen.

3. Die Methode nach MÜLLER-BEISSENHIRTZ und KELLER

Reagenzien:

- a) Aqua bidest.

- b) 10 proz. Trichloressigsäure (10 g ad 100 ml Aqua bidest.)
- c) Phenolreagens: 10 g Phenol und 50 mg Nitroprussidnatrium werden in Aqua bidest. gelöst und auf ein Endvolumen von 1 Liter gebracht.
- d) Hypochloritreagens: 90 g Dinatriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$), 10 g Natriumhydroxyd und 10 ml Hypochlorit-Lösung werden in 1 Liter Aqua bidest. gelöst; der pH-Wert dieser Lösung ist ca. 12,9. Die Hypochlorit-Lösung, auch Eau de Labarraque genannt, muß ca. 5 proz. aktives Chlor besitzen. Sie kann als technische Chlorlauge mit 15 proz. aktivem Chlor erhalten werden. Wir überprüften den Gehalt an aktivem Chlor und fanden die angegebene Konzentration bestätigt.

Methodik:

Das Blut wird einer ungestauten Vene entnommen, im Verhältnis 1:1 mit 10 proz. TCE vermischt und zentrifugiert (5 Min. bei 2000 Umdrehungen pro Min.). Für den Leerwert wird Aqua bidest. im Verhältnis 1:1 mit 10 proz. TCE vermischt. 0,5 ml des klaren Überstandes kommen in ein Reagensglas, das eisgekühlt steht. 2 ml Phenolat-Lösung werden dazugegeben, geschüttelt, 2 ml Hypochlorit-Lösung werden dann in das Glas pipettiert und abermals durch Schütteln gemischt. Daraufhin stellt man das Reagensglas für 30 Min. offen in ein Wasserbad von 37° . Nun werden die nächsten Versuche angesetzt. Die Reagensröhrchen werden nacheinander in das Wasserbad zur Farbentwicklung gestellt. Nach jeweils 30 Min. nimmt man die Gläser aus dem Wasserbad und stellt sie in ein Eisbad, bis bei allen Bestimmungen die Farbentwicklung im Wasserbad abgeschlossen ist. Die Extinktionsmessung erfolgt bei 578 m μ in einem Photometer gegen Wasser. Zur Messung der Werte wird stets dieselbe Cuvette benutzt, da die Cuvetten verschiedene Eigenabsorptionen haben, die die Werte verfälschen können.

4. Die Berechnung der Ammoniakwerte

Methode nach CONWAY: Die erhaltenen Werte sind Mittelwerte aus Doppel- und Dreifachbestimmungen. Die Extinktion des Hauptwer-

tes bzw. die Extinktion des Standardwertes abzüglich der Extinktion der Leerdiffusion ergibt die eigentliche Extinktion, deren entsprechender Ammoniakwert auf einer Eichkurve abgelesen wird. Mit Hilfe zweier Standardwerte wird jedesmal eine neue Eichkurve angelegt, um die täglichen Schwankungen auszuschalten.

Enzymatische Methode nach KIRSTEN, GEREZ und KIRSTEN: Die Abnahme der Extinktion (E), bedingt durch die Oxydation von NADH zu $\text{NAD}^{\oplus}$, ist das Maß für die Ammoniakkonzentration in den Proben. Um eine eventuelle Verunreinigung der Reagenzien auszuschließen, wird jedesmal ein Leerwert mitbestimmt. Die Höhe der Ammoniakkonzentration in der eingesetzten Untersuchungslösung wird wie folgt errechnet:

$$(E_{\text{Hauptwert}} - E_{\text{Leerwert}}) \times 0,303 \times (\text{ml Cuvetteninhalt}) = 1 \text{ Mol } \text{NH}_4^{\oplus}$$

Die Mole $\text{NH}_4^{\oplus}$ wurden in $\mu\text{g NH}_3\text{-N}/100 \text{ ml Blut}$ umgerechnet, um bei allen drei Methoden die Ammoniakkonzentration in gleicher Größenordnung angeben zu können.

Methode nach MÜLLER-BEISSENHIRTZ und KELLER: Bei jedem Bestimmungsvorgang wurde auch die Ammoniakkonzentration eines Standardwertes (S) und eines Leerwertes (L) mitbestimmt, um Veränderungen der Reagenzien auszuschließen. Folgende Formel diente zur Berechnung:

$$\frac{\mu\text{g NH}_3\text{-N}/100 \text{ ml (S)} \times E_{\text{Blutprobe}} - E_{\text{(L)}}}{E_{\text{(S)}} - E_{\text{(L)}}} = \mu\text{g NH}_3\text{-N}/100 \text{ ml Blutprobe}$$

(E = Extinktion, gemessen gegen Wasser bei 578 mμ).

Die Eichkurven der drei Methoden zur Blutammoniakbestimmung wurden mit denselben $\text{NH}_4^{\oplus}$ -Standard-Lösungen aufgestellt: 0,472 Ammoniumsulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ wurden in 1 Liter Aqua bidest. gelöst: das entspricht 100 $\mu\text{g NH}_3\text{-N}/\text{ml}$. Diese Stammlösung wurde auf Standardlösungen von 25, 50, 100, 200 und 250 $\mu\text{g NH}_3\text{-N}/100 \text{ ml}$ verdünnt. Wir wählten diese Konzentrationen, weil sie in dem Bereich liegen, in dem wir die Konzentrationen des Blutammoniaks erwarteten.

Die Eichkurven, die wir mittels der Methoden nach CONWAY, MÜLLER-BEISSENHIRTZ und KELLER erhielten, gingen durch den Null-

punkt des Ordinatenkreuzes (Ordinate: Extinktion, Abszisse: NH_3 -N-Konzentration). Die Eichkurve, aufgestellt nach der Methode von KIRSTEN, GEREZ und KIRSTEN, schnitt die Ordinate bei einer Extinktion von 0,010.

5. Versuchspersonen

Bei zehn verschiedenen Personen ohne erkennbaren Leberschaden im Alter von 22 - 32 Jahren verglichen wir an Hand von Blutproben die obengenannten Methoden. Die Versuchspersonen hatten mindestens zwei Stunden vor dem Versuch nichts zu sich genommen. Wir bestimmten den Ammoniakgehalt im Blut (d.h. Blut von einer Blutentnahme) desselben Patienten gleichzeitig mittels der drei verschiedenen Methoden. Jeweils 2 ml Blut wurden sofort mit 10 bzw. 20 proz. TCE versetzt und zentrifugiert; ca. 4 ml Blut wurden in CO_2 -begaste Fläschchen gefüllt und bei $+4^\circ$ aufbewahrt.

Die Blutammoniakbestimmung nach MÜLLER-BEISSENHIRTZ und KELLER und die enzymatische Bestimmung nach KIRSTEN, GEREZ und KIRSTEN wurden jeweils 15 Min. nach der Blutentnahme begonnen. Zwei Stunden nach der Blutentnahme begannen wir mit der Bestimmung mittels der CONWAY'schen Methode.

Bei den Methoden nach CONWAY sowie MÜLLER-BEISSENHIRTZ und KELLER wurde geprüft, ob sich der Ammoniakgehalt in den Proben während des Stehens veränderte. Das Blut zur Bestimmung nach CONWAY wurde in CO_2 -begaste Fläschchen gefüllt und bei 4° aufbewahrt, Nach 50 Min., nach 165 Min. und nach 5 Std. wurde der Ammoniakwert bestimmt. Nachdem das Blut zur Bestimmung nach MÜLLER-BEISSENHIRTZ und KELLER mit TCE versetzt und zentrifugiert war, wurde der Überstand im Eisbad gehalten und die Ammoniakkonzentration sofort, nach 10, 30, 60, 120 und 180 Min. bestimmt.

IV. E R G E B N I S S E

=====

Bei neun gesunden Versuchspersonen bestimmten wir die Ammoniakkonzentration im Blut mittels der Methode nach CONWAY. Der mittlere venöse Blutammoniakspiegel dieser Personen lag bei $41 \mu\text{g NH}_3\text{-N}/100 \text{ ml}$. Die Einzelwerte, die sich aus Doppel- und Dreifachbestimmungen ergaben, lagen zwischen $26 \mu\text{g}$ und $55 \mu\text{g NH}_3\text{-N}$. Die Standardabweichung, errechnet nach der Formel
$$s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{N - 1}}$$
, betrug ± 18 .

Bei denselben Personen bestimmten wir den Blutammoniakspiegel mittels der enzymatischen Methode. Die mittlere venöse Ammoniakkonzentration ergab einen Wert von $78 \mu\text{g NH}_3\text{-N}/100 \text{ ml}$. Die einzelnen Ergebnisse, die sich aus Doppelwerten ergaben, lagen zwischen $34 \mu\text{g}$ und $125 \mu\text{g NH}_3\text{-N}/100 \text{ ml}$. Die Standardabweichung, ermittelt nach der oben angegebenen Formel, betrug ± 32 .

Schließlich wurde bei denselben Versuchspersonen die Blutammoniakkonzentration mittels der Methode nach MÜLLER-BEISSENHIRTZ und KELLER ermittelt. Der mittlere venöse Blutammoniakspiegel betrug $63 \mu\text{g NH}_3\text{-N}/100 \text{ ml}$. Die Einzelwerte, die sich aus Dreifachbestimmungen ergaben, lagen zwischen $45 \mu\text{g}$ und $110 \mu\text{g NH}_3\text{-N}/100 \text{ ml}$. Die Standardabweichung betrug ± 20 .

Eine Zusammenstellung der Einzelwerte gibt Tabelle 2, während in Abbildung 1 die Mittelwerte für acht Versuchspersonen dargestellt sind.

Bei der Prüfung, ob sich der Ammoniakgehalt der Proben beim Stehen verändert, ergab sich folgendes: Das Blut, aufbewahrt in Penicillinflaschen mit CO_2 als Gasphase, zeigt in den ersten zweieinhalb Stunden praktisch keine Änderung des Ammoniakwertes. Nach fünf Stunden steigt der Ammoniakgehalt jedoch stark an. - Das Blut, aufbewahrt nach der Methode von MÜLLER-BEISSENHIRTZ und KELLER, zeigt keine Erhöhung der Ammoniakkonzentration während drei Stunden (Tabellen 3 und 4). Die enzymatische Methode wurde dieser Prüfung nicht unterzogen.

Tabelle 2 Zusammenstellung der mit drei verschiedenen Methoden gewonnenen Ammoniakwerte im Blut bei zehn gesunden Versuchspersonen

Versuchspersonen			Ammoniakkonzentration in $\mu\text{g NH}_3\text{-N}/100\text{ ml}$ Blut nach der Methode von		
Name	Alter	Geschl.	CONWAY Diffusions- Methode	KIRSTEN, GEREZ u. KIRSTEN Enzymatische Methode	MÜLLER-BEISSEN- HIRTZ u. KELLER Kolorimetrische Methode
B.G.	22	w	39	87	51
			37	94	45
			44	-	38
K.D.	27	m	10	58	36
			14	142	50
			54	-	48
R.K.	23	m	29	127	49
			42	124	69
			67	-	45
H.I.	24	m	42	76	48
			42	65	57
			51	-	60
M.N.	22	w	29	80	62
			47	95	56
			-	-	52
D.F.	25	w	34	73	62
			56	76	62
			-	-	58
M.L.	22	w	19	29	66
			42	40	60
			88	-	67
E.D.	32	m	57	47	85
			54	-	81
			54	-	81
J.B.	32	m	-	50	60
			-	119	45
			-	-	63
H.H.	23	w	42	-	98
			17	-	120
			-	-	112

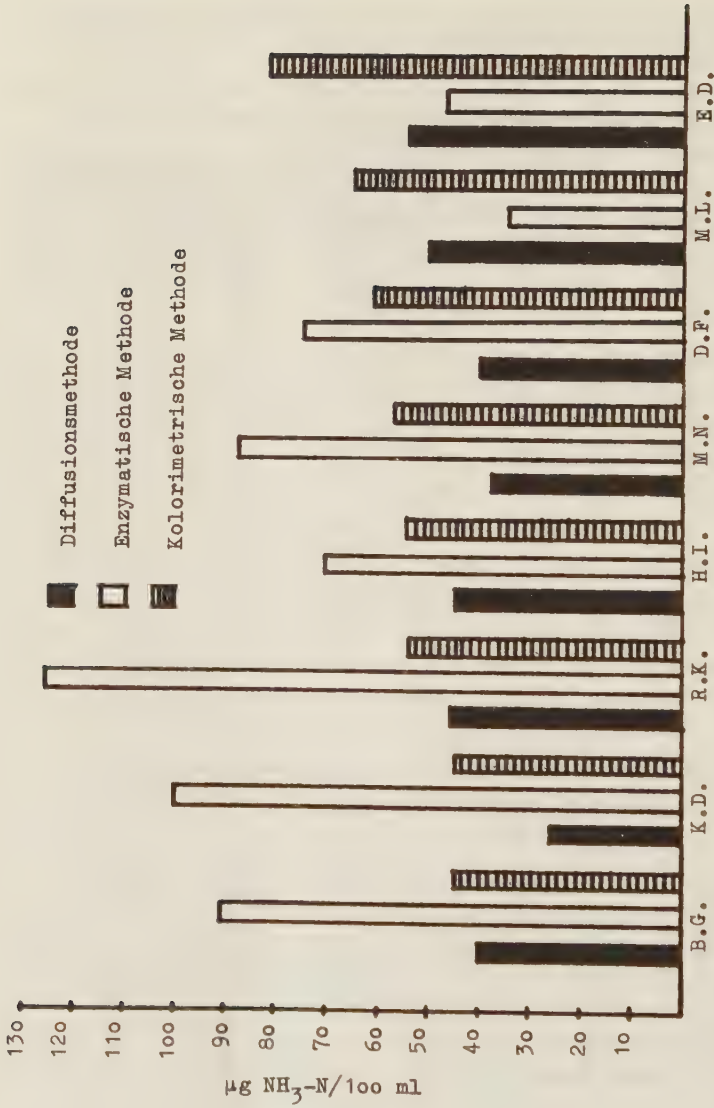


Abbildung 1 Zusammenstellung der bei acht gesunden Versuchspersonen gewonnenen Mittelwerte der Ammoniakkonzentrationen im Blut. Einzelwerte vgl. Tabelle 2

Tabelle 3 Veränderungen des Ammoniakgehaltes im Blut in Abhängigkeit von der Zeit. Die NH_3 -Bestimmung erfolgte nach der Methode nach CONWAY. Die bei derselben Blutentnahme gewonnenen Proben wurden vor der Diffusion in Penicillinflaschen mit CO_2 als Gasphase aufbewahrt.

Zeit in Min.nach der Blutentnahme	Ammoniakgehalt in $\mu\text{g NH}_3\text{-N}/100 \text{ ml}$
50	68
165	76 71
300	240 230

Tabelle 4 Veränderungen des Ammoniakgehaltes im Blut in Abhängigkeit von der Zeit. Die NH_3 -Bestimmung erfolgte nach der Methode nach MÜLLER-BEISSENHIRTZ und KELLER. Die Blutprobe wurde sofort mit TCE enteiweißt, zentrifugiert und der Rückstand bis zur Durchführung der Ammoniakbestimmung bei $+4^\circ$ aufbewahrt.

Zeit in Min.nach der Blutentnahme	Ammoniakgehalt in $\mu\text{g NH}_3\text{-N}/100 \text{ ml}$
0	84
10	71
30	77
60	81
120	64
180	74

V. DISKUSSION

=====

1. Allgemeine Gesichtspunkte

In der vorliegenden Arbeit wurden drei Methoden zur Blutammoniakbestimmung geprüft und miteinander verglichen: Die Methode nach CONWAY, modifiziert nach ROMAN und NADER, die enzymatische Methode nach KIRSTEN, GEREZ und KIRSTEN, sowie die Methode nach MÜLLER-BEISSENHIRTZ und KELLER. Den drei Methoden liegt ein unterschiedliches Reaktionsprinzip zu Grunde.

Zehn gesunden Versuchspersonen ohne erkennbare Erkrankung der Leber im Alter von 22 bis 32 Jahren wurde venöses Blut entnommen und der Ammoniakwert der zum selben Zeitpunkt erhaltenen Blutprobe mit allen drei Methoden bestimmt. Es wurde Wert darauf gelegt, daß der Zeitraum von der Blutentnahme bis zur Ammoniakbestimmung immer derselbe war.

Bei den erhaltenen Werten zeigte es sich, daß der Mittelwert der Ammoniakbestimmung nach CONWAY am niedrigsten lag ($41 \mu\text{g NH}_3\text{-N}/100 \text{ ml}$), der Mittelwert der enzymatischen Bestimmung nach KIRSTEN, GEREZ und KIRSTEN dagegen am höchsten ($78 \mu\text{g NH}_3\text{-N}/100 \text{ ml}$). Der Mittelwert der Methode nach MÜLLER-BEISSENHIRTZ und KELLER lag bei $63 \mu\text{g NH}_3\text{-N}/100 \text{ ml}$.

Die verschiedenartigen Methoden sind wohl die Ursache dafür, daß bei vergleichbaren Untersuchungsbedingungen unterschiedliche Werte gemessen wurden. Bei den hier beschriebenen Versuchen sollte festgestellt werden, ob die Ergebnisse der drei Bestimmungsmethoden bei ein und derselben Person zueinander im gleichen Verhältnis stünden.

Bei den acht Dreifachbestimmungen (d.h. drei Blutammoniakwerte bei acht Personen mit Hilfe der drei verschiedenen Bestimmungsmethoden) lagen die Werte, die wir durch die CONWAY'sche Methode erhielten, immer niedriger als die Werte nach MÜLLER-BEISSENHIRTZ und KELLER. Der geringste Unterschied betrug $5 \mu\text{g}$, der größte $27 \mu\text{g NH}_3\text{-N}/100 \text{ ml}$.

Die Blutammoniakkonzentrationen, die wir mittels der enzymatischen Methode erhielten, unterlagen dagegen großen Schwankungen. In sechs von acht Dreifachbestimmungen waren die Werte der Methode nach KIRSTEN, GEREZ und KIRSTEN höher als die Werte der beiden anderen Methoden. Die kleinste Differenz zu dem entsprechenden Wert nach MÜLLER-BEISSENHIRTZ und KELLER betrug 13 μg , die größte 71 μg $\text{NH}_3\text{-N}/100\text{ ml.}$ - In zwei von acht Dreifachbestimmungen waren die erhaltenen Werte geringer als diejenigen, die mit Hilfe der Methode nach CONWAY sowie nach MÜLLER-BEISSENHIRTZ und KELLER erhalten wurden. Die Differenzen zu den entsprechenden Werten nach MÜLLER-BEISSENHIRTZ und KELLER waren 30 μg und 35 μg $\text{NH}_3\text{-N}/100\text{ ml.}$

Beim Stehen der Proben veränderte sich der Ammoniakgehalt des Blutes, bestimmt mit der Methode nach MÜLLER-BEISSENHIRTZ und KELLER, während drei Stunden nicht; die Ammoniakkonzentration von Blutproben, die bei 4° in Penicillinflaschen mit CO_2 als Gasphase aufbewahrt und anschließend nach der CONWAY'schen Methode bestimmt wurden, stieg ebenfalls in den ersten zweieinhalb Stunden nicht an.

2. Methodenkritik

Die Richtigkeit (Abweichung vom tatsächlichen Wert) der hier geprüften Methoden läßt sich nur schwer beurteilen, da bis heute über die tatsächliche Konzentration von Ammoniak im Blut Leberkranker noch keine endgültigen Angaben vorliegen. Die Werte nach der CONWAY'schen Methode kommen den tatsächlichen Werten wahrscheinlich am nächsten, da sie generell am niedrigsten liegen.

Die Empfindlichkeit (die geringste, noch mit geringster Genauigkeit bestimmbare Substanzmenge) der drei Methoden ist in etwa gleich groß. Bei allen drei Methoden ließen sich noch 25 μg $\text{NH}_3\text{-N}/100\text{ ml}$ gut nachweisen.

Die Genauigkeit der drei Methoden war unterschiedlich. Die Standardabweichungen (5) der CONWAY'schen Methode betrugen 10,5, die der enzymatischen Methode 6,0, die Standardabweichungen der Methode nach MÜLLER-BEISSENHIRTZ und KELLER 7,0.

Der apparative Aufwand der drei Methoden ist etwa gleich groß. Für alle drei Bestimmungen wird ein Photometer zum Ablesen der Extinktion gebraucht. Der Aufwand an Glassachen ist bei der Methode nach CONWAY größer als bei beiden anderen Methoden, weil die CONWAY' Schälchen besonders angefertigt werden müssen. Der Platz, den die Versuchsanordnung nach CONWAY und nach KIRSTEN, GEREZ und KIRSTEN einnimmt, ist größer als derjenige, der zur Durchführung der Methode nach MÜLLER-BEISSENHIRTZ und KELLER benötigt wird.

Die laufenden Kosten der drei Bestimmungen sind in etwa gleich, abgesehen von dem Enzym Glutamatdehydrogenase, das relativ teuer ist.

Der Zeitbedarf für das Ansetzen der verschiedenen Lösungen ist sehr unterschiedlich. Für die Methode nach CONWAY werden sieben Lösungen gebraucht, von denen einige erhitzt, gekühlt und filtriert werden müssen. Zwei dieser Lösungen, die H_2SO_4 - und die Natrium-Phenolat-Lösung, sind außerdem vor jeder Bestimmung frisch anzusetzen. Für die enzymatische Methode nach KIRSTEN, GEREZ und KIRSTEN ist die Zubereitung von sechs Lösungen erforderlich, wobei lediglich das Neutralisieren der Lösungen eines besonderen Zeitaufwandes bedarf. Die alpha-Ketoglutaratsäurelösung ist jedoch nur einige Tage haltbar und muß daher nach einer Woche frisch angesetzt werden. Für die Methode nach MÜLLER-BEISSENHIRTZ und KELLER dagegen benötigt man nur drei Lösungen, die sich im Eisschrank mehrere Wochen halten. Auch der Zeitbedarf für die Durchführung der drei Methoden ist unterschiedlich.

Sowohl bei der Methode nach CONWAY als auch bei derjenigen nach KIRSTEN, GEREZ und KIRSTEN können vier Bestimmungen in einem Arbeitsgang durchgeführt werden. Auch der Zeitaufwand ist bei beiden Methoden gleich. Er beträgt - bis zum Ablesen der Werte im Photometer - jeweils etwa eineinhalb Stunden. Die Methode nach MÜLLER-BEISSENHIRTZ und KELLER ermöglicht dagegen mindestens 15 Bestimmungen in nur knapp einer Stunde. Außerdem erfordert die Durchführung der Methode nach MÜLLER-BEISSENHIRTZ und KELLER bei weitem nicht die gleiche Arbeitskonzentration wie bei den beiden

anderen Methoden.

Der Schwierigkeitsgrad. Die Schwierigkeit der CONWAY'schen Methode liegt im Ansetzen der Reagenzien und im eigentlichen Bestimmungsvorgang, der auch nach längerer Einarbeitung nicht leicht durchzuführen ist. Die Schwierigkeit der enzymatischen Methode besteht hauptsächlich im Ansetzen der Lösungen. Der Versuch selbst ist nach einiger Zeit der Einarbeitung relativ einfach. Die Schwierigkeit der Methode nach MÜLLER-BEISSENHIRTZ und KELLER ist sowohl hinsichtlich des Ansetzens der Lösungen wie auch des Bestimmungsvorganges gering. Es bedarf praktisch nur einer geringen Einarbeitungszeit.

3. Schlußfolgerung

Da mit Hilfe der drei oben genannten Methoden in etwa die gleichen Ammoniakkonzentrationen im venösen Blut gefunden wurden, die Methode nach MÜLLER-BEISSENHIRTZ und KELLER aber bei weitem am leichtesten durchzuführen ist, scheint sie uns für die Klinik sehr geeignet zu sein. Die Einführung dieser Methode erlaubt es erstmalig auch kleineren Krankenhäusern, die wichtige Ammoniakkonzentration durchzuführen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Drei Methoden zur Blutammoniakbestimmung wurden vergleichend untersucht, nämlich 1.) die Diffusions-Methode nach CONWAY, modifiziert nach ROLAH und NABER, 2.) die enzymatische Methode nach KIRSTEN, GEREN und KIRSTEN und 3.) die kolorimetrische Methode nach MÜLLER-BEISSENHIRTZ und KELLER.

Es stellte sich heraus, daß mit Hilfe der drei Methoden bei denselben Versuchspersonen in etwa die gleichen Werte gefunden wurden. Die mittleren venösen Blut-Ammoniakwerte (Schwankungen in Klammern) betrugen nach der CONWAY'schen Methode 41 ($26 - 56$) $\mu\text{g NH}_3/\text{l}$ 100 ml, nach der enzymatischen Methode 76 ($54 - 114$) $\mu\text{g NH}_3/\text{l}$ 100 ml, nach der Methode von MÜLLER-BEISSENHIRTZ und KELLER 83 ($49 - 110$) $\mu\text{g NH}_3/\text{l}$ 100 ml. Die Standardabweichungen (berechnet nach der Formel $S = \sqrt{\frac{\sum x^2}{N} - \frac{\bar{x}^2}{1}}$) der angeführten Methoden betrugen ± 18 , ± 32 und ± 20 .

Die Methode nach MÜLLER-BEISSENHIRTZ und KELLER ist im Gegensatz zu den beiden anderen Methoden technisch wenig aufwendig, schnell und störungsempfindlich; sie ergibt die gleichen Werte wie die Diffusions- und die enzymatische Methode. Wir halten daher das kolorimetrische Verfahren von MÜLLER-BEISSENHIRTZ und KELLER für die am besten geeignete Methode und sind der Meinung, daß selbst kleinere Kliniken außer mit dieser Methode eine Ammoniakbestimmung durchführen können.

Herrn Professor Dr. H. B r e u e r danke ich herzlich
für die Überlassung des Themas und für die wertvolle
Anregung und Hilfe, die er mir zuteil werden ließ.

Herrn Dr. J. B r e u e r und Frau I. P e c h t h o l d
sage ich für ihre freundliche Unterstützung bei den
Versuchen im chemischen Laboratorium.

L e b e n s l a u f

Am 1. Oktober 1941 wurde ich, Rosemarie W e g m a n n , als Tochter des Treuhandprokuristen Walter Wegmann und seiner Ehefrau Barbara, getorene Rintelen, in Bad Godesberg geboren.

Von Ostern 1952 bis Ostern 1961 besuchte ich die Clara-Fey-Schule, ein Neusprachliches Mädchengymnasium, die ich mit dem Zeugnis der Reife vom 3. Februar 1961 verließ.

Vom Sommersemester 1961 an studierte ich Medizin an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität in Bonn. Im 6. Semester war ich Studentin der Universität Hamburg, im 10. Semester studierte ich an der Bayrischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg. Am 29. April 1962 legte ich in Bonn die naturwissenschaftliche, am 3. August 1963 die ärztliche Vorprüfung ab. Das Studium der Medizin beendete ich mit der ärztlichen Prüfung vom 13. Februar 1967 in Bonn.

Im September 1964 begann ich die vorliegende Promotionsarbeit bei Herrn Professor Dr. H. B r e u e r , deren experimentellen Teil ich Ende April 1965 abschloß.

